

## 明細書

### 顕微鏡およびその光学調整方法

#### 発明の背景

##### 発明の属する技術分野

###### 【0001】

本発明は、顕微鏡、特に染色した試料を機能性の高いレーザ光源からの複数の波長の光により照明して、高い空間分解能を得る高性能かつ高機能の新しい光学顕微鏡およびその光学調整方法に関するものである。

##### 関連技術の説明

###### 【0002】

光学顕微鏡の技術は古く、種々のタイプの顕微鏡が開発されてきた。また、近年では、レーザ技術および電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩により、更に高機能の顕微鏡システムが開発されている。

###### 【0003】

このような背景の中、複数波長の光で試料を照明することにより発する二重共鳴吸収過程を用いて、得られる画像のコントラストの制御のみならず化学分析も可能にした高機能な顕微鏡が提案されている（例えば、特開平8-184552号公報参照）。

###### 【0004】

この顕微鏡は、二重共鳴吸収を用いて特定の分子を選択して、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観測するものである。この原理について、図4～図7を参照して説明する。図4は、試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示すもので、先ず、図4に示す基底状態（S0状態）の分子がもつ価電子軌道の電子を波長λ1の第1の光により励起して、図5に示す第1電子励起状態（S1状態）とする。次に、別の波長λ2の第2の光により同様に励起して、図6に示す第2電子励起状態（S2状態）とする。この励起状態により、分子は蛍光あるいは燐光を発光して、図7に示すように基底状態に戻る。

###### 【0005】

二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、図5の吸収過程や図7の蛍光や燐光の発光を用いて、吸収像や発光像を観察する。この顕微鏡法では、最初にレーザ光等により共鳴波長λ1の光で図5のように試料を構成する分子をS1状態に励起させるが、この際、単位体積内でのS1状態の分子数は、照射する光の強度が増加するに従って増加する。

【0006】

ここで、線吸収係数は、分子一個当たりの吸収断面積と単位体積当たりの分子数との積で与えられるので、図6のような励起過程においては、続いて照射する共鳴波長 $\lambda_2$ に対する線吸収係数は、最初に照射した波長 $\lambda_1$ の光の強度に依存することになる。すなわち、波長 $\lambda_2$ に対する線吸収係数は、波長 $\lambda_1$ の光の強度で制御できることになる。このことは、波長 $\lambda_1$ および波長 $\lambda_2$ の2波長の光で試料を照射し、波長 $\lambda_2$ による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストは波長 $\lambda_1$ の光で完全に制御できることを示している。

【0007】

また、図6の励起状態での蛍光または燐光による脱励起過程が可能である場合には、その発光強度はS1状態にある分子数に比例する。したがって、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。

【0008】

さらに、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、上記の画像コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。すなわち、図4に示される最外殻価電子軌道は、各々の分子に固有なエネルギー準位を持つので、波長 $\lambda_1$ は分子によって異なることになり、同時に波長 $\lambda_2$ も分子固有のものとなる。

【0009】

ここで、従来の单一波長で照明する場合でも、ある程度特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能であるが、一般にはいくつかの分子における吸収帯の波長領域は重複するので、試料の化学組成の正確な同定までは不可能である。

【0010】

これに対し、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、波長 $\lambda_1$ および波長 $\lambda_2$ の2波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので、従来法よりも正確な試料の化学組成の同定が可能となる。また、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルをもつ光のみが強く吸収されるので、波長 $\lambda_1$ および波長 $\lambda_2$ の偏光方向を決めて吸収または蛍光像を撮影すれば、同じ分子でも配向方向の同定まで可能となる。

【0011】

また、最近では、二重共鳴吸収過程を用いて回折限界を越える高い空間分解能をもつ蛍光顕微鏡も提案されている（例えば、特開2001-100102号公報参照）。

【0012】

図8は、分子における二重共鳴吸収過程の概念図で、基底状態S0の分子が、波長 $\lambda_1$ の第1の光で第1電子励起状態であるS1に励起され、更に波長 $\lambda_2$ の第2の光で第2電子励起状態であるS2に励起されている様子を示している。なお、図8はある種の分子のS2からの蛍光が極めて弱いことを示している。

【0013】

図8に示すような光学的性質を持つ分子の場合には、極めて興味深い現象が起きる。図9は、図8と同じく二重共鳴吸収過程の概念図で、横軸のX軸は空間的距離の広がりを表わし、波長 $\lambda_2$ の第2の光を照射した空間領域A1と第2の光が照射されない空間領域A0とを示している。

【0014】

図9において、空間領域A0では波長 $\lambda_1$ の第1の光の励起によりS1状態の分子が多数生成され、その際に空間領域A0からは波長 $\lambda_3$ で発光する蛍光が見られる。しかし、空間領域A1では、波長 $\lambda_2$ の第2の光を照射したため、S1状態の分子のほとんどが即座に高位のS2状態に励起されて、S1状態の分子は存在しなくなる。このような現象は、幾つかの分子により確認されている。これにより、空間領域A1では、波長 $\lambda_3$ の蛍光は完全になくなり、しかもS2状態からの蛍光はもともとのない、空間領域A1では完全に蛍光自体が抑制され（蛍光抑制効果）、空間領域A0からのみ蛍光が発することになる。

【0015】

このことは、顕微鏡の応用分野から考察すると、極めて重要な意味を持っている。すなわち、従来の走査型レーザ顕微鏡等では、レーザ光を集光レンズによりマイクロビームに集光して観察試料上を走査するが、その際のマイクロビームのサイズは、集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界となり、原理的にそれ以上の空間分解能は期待できない。

【0016】

ところが、図9の場合には、波長 $\lambda_1$ と波長 $\lambda_2$ との2種類の光を空間的に上手く重ね合わせて、波長 $\lambda_2$ の光の照射により蛍光領域を抑制することで、例えば波長 $\lambda_1$ の光の照射領域に着目すると、蛍光領域を集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界よりも狭くでき、実質的に空間分解能を向上させることが可能となる。したがって、この原理を利用することで、回折限界を越える二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡、例えば蛍光顕微鏡を実現することが可能となる。以下、波長 $\lambda_1$ の第1の光をポンプ光とも呼び、波長 $\lambda_2$ の第

2の光をイレース光とも呼ぶ。

【0017】

図10は、通常のレーザ走査型蛍光顕微鏡を前提にした従来の超解像顕微鏡の概略構成を示すものである。この超解像顕微鏡は、主に、光源ユニット50、スキャンユニット60および顕微鏡ユニット70の独立した三つのユニットから構成されている。

【0018】

光源ユニット50は、波長532nm（2倍高調波）のポンプ光を発生するLD励起型モードロックNd:YAGレーザ51と、波長647nmのイレース光を発生する連続発振型のKrレーザ52と、イレース光を空間変調する位相板53と、ポンプ光およびイレース光を同軸上に融合するビームコンバイナ54とを有しており、LD励起型モードロックNd:YAGレーザ51からのポンプ光と、Krレーザ52から発生されて位相板53で空間変調されたイレース光とをビームコンバイナ54で同軸上に合成してスキャンユニット60に出射するようになっている。

【0019】

ここで、位相板53は、光軸対称位置を通過するイレース光の位相が反転するように光学薄膜を蒸着して構成され、例えば図11に示すように、光軸の周りにイレース光の波長に対して1/4ずつ位相を異ならせた独立した四つの領域を有して構成される。したがって、この位相板53を透過した光を集めすれば、光軸上で電場が相殺された中空状のイレース光が生成される。

【0020】

スキャンユニット60は、ハーフミラー61、ガルバノミラー62および63、投影レンズ64、ピンホール65、ノッチフィルタ66および67、光電子増倍管68を有している。このスキャンユニット60では、光源ユニット50からのポンプ光およびイレース光を、ハーフミラー61を透過させた後、ガルバノミラー62および63により二次元方向に偏向させて顕微鏡ユニット70に出射させると共に、顕微鏡ユニット70で検出される蛍光を、ガルバノミラー63および62を経てハーフミラー61で反射させた後、投影レンズ64、ピンホール65、ノッチフィルタ66および67を経て光電子増倍管68で受光するようになっている。

【0021】

ここで、ピンホール65は、共焦点位置に配置されており、空間フィルタと

して機能する。これは、顕微鏡ユニット70にセットされる試料以外から発する、例えば光学系からの蛍光や散乱光をカットして測定のS/Nを高める作用をなすのと同時に、試料内の特定の深さ部分から発光した蛍光のみを選別するオプティカルセクショニングの機能をもつ。また、ノッチフィルタ66および67は、蛍光に混入したポンプ光およびイレース光を除去する役目をする。

【0022】

顕微鏡ユニット70は、いわゆる通常の蛍光顕微鏡で、ハーフミラー71、対物レンズ72および接眼レンズ73を有しており、スキャンユニット60からのポンプ光およびイレース光を、ハーフミラー71で反射させた後、集光光学系を構成する対物レンズ72により試料74に集光させ、これにより試料74から発する蛍光を、対物レンズ72を経てハーフミラー71で反射させてスキャンユニット60に出射させると共に、ハーフミラー71を透過した蛍光を観察手段を構成する接眼レンズ73に導いて蛍光像を目視観察できるようになっている。

【0023】

この超解像顕微鏡によると、試料74の集光点上において、イレース光の強度がゼロとなる光軸近傍以外の蛍光が抑制されるので、ポンプ光（波長 $\lambda_1$ ）の広がりより狭い領域 ( $\Delta < 0.61 \cdot \lambda_1 / NA$ , NAは対物レンズ72の開口数) に存在する蛍光ラベラー分子のみが観察され、結果的に超解像性が発現することになる。

【0024】

したがって、ポンプ光およびイレース光をスキャンユニット60で走査しながら蛍光信号を測定すれば、超解像の2次元蛍光像を得ることができる。

【0025】

しかしながら、従来提案されている超解像顕微鏡にあっては、実用上、以下に説明するような問題がある。すなわち、超解像顕微鏡では、ポンプ光の中心部とイレース光の中心部とを確実に位置合わせして、集光したポンプ光の辺縁部の蛍光を消去することが最大のキーテクノロジーであり、ポンプ光およびイレース光の集光位置がずれると、ポンプ光の中央部の蛍光も消去されて、結果として全体の蛍光強度が低下するだけで、空間分解能は向上せず、S/Nだけが悪くなることになる。

【0026】

ところが、超解像顕微鏡では、ポンプ光およびイレース光を回折限界に絞り

込んだサイズが数 100 nm となるため、その位置合わせ精度は少なくとも 100 nm のオーダを上回ることになる。このため、図 10 に示したように、単に、LD 励起型モードロック Nd : YAG レーザ 51 から出射されるポンプ光と、Kr レーザ 52 から位相板 53 を経て出射されるイレース光とを、ビームコンバイナ 54 に直接入射させて高精度に位置合わせするのは極めて困難である。

#### 発明の概要

##### 【0027】

したがって、かかる点に鑑みてなされた本発明の目的は、第 1 の光および第 2 の光の光学的調整を容易かつ高精度に行うことができ、超解像効果や期待する光学性能を確実に発現できる顕微鏡およびその光学調整方法を提供することにある。

##### 【0028】

上記目的を達成するために、本発明の第 1 様によれば、少なくとも基底状態を含む 3 つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第 1 電子励起状態に励起するための第 1 の光を発生する第 1 の光源と、上記分子を上記第 1 電子励起状態から、よりエネルギー準位の高い第 2 電子励起状態に励起するための第 2 の光を発生する第 2 の光源とを具え、集光光学系により一部重ね合わせて照射して、上記試料からの発光を検出するようにした顕微鏡において、上記第 1 の光源からの第 1 の光を二次元的に偏向する第 1 の偏向手段と、上記第 2 の光源からの第 2 の光を二次元的に偏向する第 2 の偏向手段と、上記第 1 の偏向手段により偏向された第 1 の光および上記第 2 の偏向手段により偏向された第 2 の光を、同一光軸上または互いに平行な光軸上を同一方向に進行するように合成する合成手段と、上記合成手段で合成された第 1 の光および第 2 の光を同時に偏向する第 3 の偏向手段とを有することを特徴とするものである。

##### 【0029】

本発明の実施に当たり、上記第 1 の偏向手段は、互いに独立して偏向角を調整可能な少なくとも二つの角度調整ミラーまたはプリズムを有する。

##### 【0030】

上記第 2 の偏向手段は、互いに独立して偏向角を調整可能な少なくとも二つの角度調整ミラーまたはプリズムを有する。

【0031】

上記第3の偏向手段は、互いに独立して偏向角を調整可能な少なくとも二つの角度調整ミラーまたはプリズムを有する。

【0032】

上記第1の光源と上記第1の偏向手段との間の光路中および／または上記第2の光源と上記第2の偏向手段との間の光路中には位相変調素子を設ける。

【0033】

上記第1の光源と上記合成手段との間の光路中に、上記第1の光の発散角を調整する第1の発散角調整手段を設ける。

【0034】

上記第2の光源と上記合成手段との間の光路中に、上記第2の光の発散角を調整する第2の発散角調整手段を設ける。

【0035】

上記合成手段で合成された第1の光および第2の光の光路中に、これら第1の光および第2の光の発散角を同時に調整する第3の発散角調整手段を設ける。

【0036】

上記第1の発散角調整手段が、光学レンズまたは反射鏡からなる。

上記第2の発散角調整手段が、光学レンズまたは反射鏡からなる。

【0037】

上記第3の発散角調整手段が、光学レンズまたは反射鏡からなる。

上記第1の発散角調整手段および上記第1の偏向手段の光学精度を、上記第1の光の波長に対して $1/10$ 波長以下とする。

【0038】

上記第2の発散角調整手段および上記第2の偏向手段の光学精度を、上記第2の光の波長に対して $1/10$ 波長以下とする。

上記第1の光および／または上記第2の光のビーム径を調整するビーム径調整手段を設ける。

【0039】

上記集光光学系の焦点面における上記第1の光および上記第2の光の集光状態を観察する観察手段を設ける。

【0040】

本発明の第2態様によれば、少なくとも基底状態を含む3つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第1電子励起状態に励

起するための第1の光を発生する第1の光源と、上記分子を上記第1電子励起状態から、よりエネルギー準位の高い第2電子励起状態に励起するための第2の光を発生する第2の光源と、集光光学系により一部重ね合わせて照射して、上記試料からの発光を検出するようにした顕微鏡であって、上記第1の光源からの第1の光を二次元的に偏向する第1の偏向手段と、上記第2の光源からの第2の光を二次元的に偏向する第2の偏向手段と、上記第1の偏向手段により偏向された第1の光および上記第2の偏向手段により偏向された第2の光を、同一光軸上または互いに平行な光軸上を同一方向に進行するように合成する合成手段と、上記合成手段で合成された第1の光および第2の光を同時に偏向する第3の偏向手段と、上記集光光学系の焦点面における上記第1の光および上記第2の光の集光状態を観察する観察手段とを具える顕微鏡の光学調整を行うに当たり、上記集光光学系の焦点面に反射部材を設置して上記観察手段により上記焦点面を観察しながら、上記第1の偏向手段および上記第2の偏向手段により上記第1の光の光軸および上記第2の光の光軸を独立して調整すると共に、上記第3の偏向手段により上記第1の光の光軸および上記第2の光の光軸を同時に調整して、上記焦点面における上記第1の光および上記第2の光の位置合わせを行うことを特徴とする。

【0041】

上記反射部材としてスライドガラスを用いる。

【0042】

本発明は、波長の異なる第1の光および第2の光を同時に照射する光走査型顕微鏡に適用可能であり、第1の偏向手段および第2の偏向手段により第1の光および第2の光の偏向方向を独立して調整することで、合成手段において第1の光および第2の光を同一光軸上または互いに平行な光軸上を同一方向に進行するように合成することが可能となり、また合成された第1の光および第2の光の偏向方向を第3の偏向手段により同時に調整することで、焦点面における第1の光および第2の光の位置合わせを容易かつ高精度で行うことが可能となり、その結果、超解像顕微鏡においては超解像効果を確実に発現することが可能となる。

【0043】

また、第1の光の発散角を調整する第1の発散角調整手段、第2の光の発散角を調整する第2の発散角調整手段、第1の光および第2の光の発散角を同時に調整する第3の発散角調整手段を適宜付加したり、第1の光および／または

第2の光のビーム径を調整するビーム径調整手段を適宜付加したりすることで、より確実に第1の光および第2の光を同一焦点面に最小サイズで集光することが可能となる。

#### 【0044】

さらに、第1の光源と第1の偏向手段との間の光路中および／または第2の光源と第2の偏向手段との間の光路中に位相変調素子を設けることで、第1の光および／または第2の光を確実に空間変調した後に、それらの光軸調整を行うことが可能となり、光軸調整によって第1の光および／または第2の光の変調条件が影響されることもなくなる。また、第1の発散角調整手段および第1の偏向手段の光学精度（波面収差）を第1の光の波長に対して $1/10$ 波長以下としたり、第2の発散角調整手段および第2の偏向手段の光学精度（波面収差）を第2の光の波長に対して $1/10$ 波長以下としたりすることで、変調された位相分布の乱れを抑制でき、顕微鏡機能の劣化を防止することが可能となる。

#### 【0045】

本発明によれば、波長の異なる第1の光および第2の光を一部重ね合わせて試料に照射する顕微鏡において、第1の光を二次元的に偏向する第1の偏向手段、第2の光を二次元的に偏向する第2の偏向手段、第1の光および第2の光を同時に偏向する第3の偏向手段を設けたので、第1の光および第2の光の光学的調整を容易かつ高精度に行うことができ、超解像効果や期待する光学性能を確実に発現することができる。

#### 【0046】

また、本発明による顕微鏡の光学調整方法によれば、集光光学系の焦点面に反射部材を設置して顕微鏡の観察手段により焦点面を観察しながら、第1の偏向手段による第1の光の光軸調整および第2の偏向手段による第2の光の光軸調整を独立して行うと共に、第3の偏向手段により第1の光および第2の光の光軸調整を同時に行うようにしたので、焦点面における第1の光および第2の光の位置合わせを容易かつ高精度に行うことができ、超解像効果や期待する光学性能を確実に発現することができる。

#### 【0047】

##### 図面の簡単な説明

図1は本発明の一実施の形態における顕微鏡の概略構成図であり、

図2は光学素子の波面収差による影響を説明するための図であり、

図3は波面収差を評価するシステムの一例の構成を示す図であり、  
図4は試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示す概念図であり、  
図5は図4の分子の第1励起状態を示す概念図であり、  
図6は同じく、第2励起状態を示す概念図であり、  
図7は同じく、第2励起状態から基底状態に戻る状態を示す概念図であり、  
図8は分子における二重共鳴吸収過程を説明するための概念図であり、  
図9は同じく、二重共鳴吸収過程を説明するための概念図であり、  
図10は従来の超解像顕微鏡の一例の構成を示す図であり、  
図11は図10に示す位相板の構成を示す斜視図である。

#### 【0048】

##### 好適な実施例の詳細な説明

以下、本発明の実施の形態について、図面を参照して詳細に説明する。

#### 【0049】

図1は、本発明の一実施の形態における顕微鏡の概略構成を示すもので、蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡に適用した場合の構成を示している。この超解像顕微鏡は、図10に示した超解像顕微鏡と同様に、主として、光源ユニット10、スキャンユニット30および顕微鏡ユニット40の独立した三つのユニットから構成されているが、スキャンユニット30および顕微鏡ユニット40については、図10に示したスキャンユニット60および顕微鏡ユニット70と同様の構成であるので、同一構成要素には同一参照番号を付してその説明を省略し、光源ユニット10について詳細に説明する。以下、ローダミン6Gで染色された生体試料を観察する場合を例にとって説明する。

#### 【0050】

ローダミン6Gは、波長530nm近傍に基底状態(S0)から第1電子励起状態(S1)に励起される吸収帯があり、また、波長600nm～650nmの帯域に第1電子励起状態(S1)から、よりエネルギー準位の高い第2電子励起状態(S2)に励起される二重共鳴吸収帯域が存在することが確認されている(例えば、E.Sahar and D.Treves: IEEE, J.Quantum Electron., QE-13, 692(1977)参照)。

#### 【0051】

そこで、本実施の形態では、第1の光源としてLD励起型モードロックNd:YAGレーザー11を用い、このNd:YAGレーザー11から出力される2倍高調波の波長532nmのレーザ光をポンプ光(第1の光)として用いる。

また、第2の光源は連続発振型のK r レーザ1 2を用い、このK r レーザ1 2から出力される波長6 4 7 nmのレーザ光をイレース光（第2の光）として用い、このイレース光を、図1 1に示した位相板と同様の構成からなる位相板1 3を透過させることにより空間変調して中空ビームに整形する。

【0 0 5 2】

ところで、超解像顕微鏡では、顕微鏡ユニット4 0の試料焦点面で、ポンプ光とイレース光とが完全に同光軸で、集光点が一致することが不可欠である。そのためには、Nd : YAGレーザ1 1からのポンプ光およびK r レーザ1 2からのイレース光のそれぞれの発散角を調整して、完全に平行光とすることが要求される。また、ポンプ光とイレース光とを最小サイズで集光するためには、それらのビーム径と顕微鏡ユニット4 0の集光光学系を構成する対物レンズ7 2の口径とを一致させることも要求される。

【0 0 5 3】

このため、本実施の形態では、Nd : YAGレーザ1 1からのポンプ光を、第1の偏向手段としての例えば二枚の角度調整ミラー1 4 a, 1 4 bにより二次元的に偏向して光軸を調整すると共に、第1の発散角調整手段としての例えば発散角調整レンズ1 5により完全な平行光に調整して、合成手段を構成するビームコンバイナ1 6に入射させる。

【0 0 5 4】

同様に、K r レーザ1 2からのイレース光についても、第2の偏向手段としての例えば二枚の角度調整ミラー1 7 a, 1 7 bにより二次元的に偏向して光軸を調整すると共に、第2の発散角調整手段としての例えば発散角調整レンズ1 8により完全な平行光に調整して、ビームコンバイナ1 6に入射させる。これにより、ビームコンバイナ1 6においてポンプ光とイレース光とを同軸上に合成する。

【0 0 5 5】

また、ビームコンバイナ1 6で同軸上に合成されて出射されるポンプ光およびイレース光は、第3の偏向手段としての例えば二枚の角度調整ミラー1 9 a, 1 9 bにより二次元的に同時に偏向して、スキャンユニット3 0に対する光軸を調整すると共に、ビーム径調整手段としての例えばアイリス2 0によりポンプ光およびイレース光のビーム径を、顕微鏡ユニット4 0の対物レンズ7 2の口径と一致するように調整してスキャンユニット3 0に出射する。さらに、必要に応じて、ビームコンバイナ1 6の出射側にも、第3の発散角調整手段とし

ての例えは発散角調整レンズ 2 1 を設け、これによりポンプ光およびイレース光を、同時に平行光に調整し直す。

【0056】

上述した調整作業は、顕微鏡ユニット 4 0 の焦点面に反射部材としての例えはスライドガラスを配置し、このスライドガラスで反射されるポンプ光およびイレース光を、観察手段を構成する接眼レンズ 7 3 を通して観察しながら行う。

【0057】

さらに詳しくは、先ず、位相板 1 3 をイレース光の光路から外した状態で、接眼レンズ 7 3 を通して焦点面を観察しながら、上述したようにしてポンプ光とイレース光との光軸を調整する。次に、イレース光の光路に位相板 1 3 を挿入してイレース光を中空状に空間変調し、その状態で、イレース光が焦点面において期待通りの中空状になっているか否かを、同様に接眼レンズ 7 3 を通して確認する。ここで、イレース光が完全な中空状になっていない場合には、接眼レンズ 7 3 を通して焦点面におけるイレース光のスポット形状を観察しながら、位相板 1 3 の中心とイレース光の光軸とが完全に一致するように、位相板 1 3 の挿入位置を微調整する。

【0058】

以上の調整により、顕微鏡ユニット 4 0 の焦点面において、イレース光の中空部中央とポンプ光の強度中心とを一致させて超解像効果を発現できる調整条件を確立し、顕微鏡システム全体の光学調整を終了する。

【0059】

その後は、顕微鏡ユニット 4 0 の焦点面に色素発光体を含む試料 7 4 を設置し、スキャンユニット 3 0 のガルバノミラー 6 2, 6 3 によりポンプ光およびイレース光を二次元走査しながら、試料 7 4 からの蛍光を光電子増倍管 6 8 で受光すれば、コンピュータ上で二次元蛍光画像を得ることができる。また、接眼レンズ 7 3 を含む観察光学系に散乱光を取り除くための適当なフィルタを挿入すれば、試料面における蛍光抑制効果も直接目視することができる。

【0060】

ところで、図 1 に示す構成において、位相板 1 3 にイレース光を入射させると、理論的にはイレース光は理想的な中空状に整形されるが、例えば光源ユニット 1 0 内のイレース光の光路に配置されている光学素子の加工精度が不十分であったりすると、光軸調整によってイレース光の波面が乱れて集光点で崩れた形状に変形し、結果として超解像性が発現せず、S/Nが低下するだけにな

ると言う弊害が生じる。

【0061】

これを防止するには、例えば、K r レーザ1 2と第2の偏向手段を構成する角度調整ミラー1 7 aとの間に、例えば位相板からなる位相変調素子を配置して、イレース光を確実に空間変調する。このようにすれば、光軸調整によってイレース光の変調条件に影響を与えることがなくなる。

【0062】

ポンプ光についても同様で、光軸調整によってポンプ光の波面が乱れて集光点で崩れた形状に変形する場合には、N d : Y A G レーザ1 1と第1の偏向手段を構成する角度調整ミラー1 4 aとの間に、例えば位相板からなる位相変調素子を配置して、ポンプ光を確実に空間変調すれば、光軸調整によってポンプ光の変調条件に影響を与えることがなくなる。

【0063】

また、本発明者による実験検討によると、光学素子の加工精度が、波長入に対してr.m.sの評価で $\lambda/10$ 以下の波面収差を発生させる程度であれば、集光点において比較的良好な形状のスポットが得られることが確かめられた。図2 (a) および (b) はその実験結果を示すもので、図2 (a) は一枚の集光レンズが発生する波面収差が $\lambda/10$ のときのスポット形状と強度分布とを示しており、図2 (b) は同じく $\lambda/4$ のときのスポット形状と強度分布とを示している。

【0064】

図3は、上記の実験に用いた評価システムの構成を示すものである。この評価システムは、H e - N e レーザ8 1からの波長入(632 nm)のレーザ光を、空間フィルタ8 2で均一波面に変換した後、 $\lambda/20$ の光学精度を有するコリメータレンズ8 3で平行光に変換して液晶型光書き込み光空間変調器8 4に入射させ、ここで空間変調されて反射される反射光を、交換可能な結像レンズ8 5により結像して、そのスポット像をC C Dカメラ8 6で撮影するようにしたものである。なお、液晶型光書き込み光空間変調器8 4は、波面収差が $\lambda/10$ 以下となるように予め波面補正しておくと共に、この液晶型光書き込み光空間変調器8 4には、図1 1に示した位相板に対応する屈折率分布を光書き込みしておく。

【0065】

図2 (a) は、上記の評価システムにおいて、結像レンズ8 5として波面収

差が $\lambda/10$ のものを用いた場合のCCDカメラ86による結像スポットの撮影画像を示しており、図2（b）は、結像レンズ85として波面収差が $\lambda/4$ のものを用いた場合のCCDカメラ86による結像スポットの撮影画像を示している。

#### 【0066】

図2（a）および（b）から明らかなように、図2（a）に示す波面収差が $\lambda/10$ の場合には、スポット形状が良好なリング形状を成しており、上下左右の強度もバランスがとれている。これに対して、図2（b）に示す波面収差が $\lambda/4$ の場合には、スポット形状が上下左右で強度バランスが崩れた形状に歪んでおり、中央部分にも強度成分が残存している。なお、ポンプ光についても同様で、発生する波面収差が $\lambda/10$ 以下のときは、スポット形状は良好な円形となるが、 $\lambda/4$ の波面収差が発生すると、スポット形状は良好な円形とならず、歪んだものとなってしまう。

#### 【0067】

したがって、本実施の形態では、好ましくは、Nd:YAGレーザ11からビームコンバイナ16に至るポンプ光の光路に配置される光学素子の光学精度、すなわち図1においては第1の偏向手段を構成する角度調整ミラー14a, 14bおよび第1の発散角調整手段を構成する角度調整レンズ15のそれぞれの光学精度を、ポンプ光の波長（532nm）に対して1/10波長以下とする。同様に、Krレーザ12からビームコンバイナ16に至るイレース光の光路に配置される光学素子の光学精度、すなわち図1においては第2の偏向手段を構成する角度調整ミラー17a, 17bおよび第2の発散角調整手段を構成する角度調整レンズ18のそれぞれの光学精度を、イレース光の波長（647nm）に対して1/10波長以下とする。このようにすれば、ポンプ光およびイレース光の位相分布の乱れを抑制でき、顕微鏡機能の劣化を防止することができる。

#### 【0068】

なお、本発明は、上記実施の形態にのみ限定されるものではなく、幾多の変形または変更が可能である。例えば、上記実施の形態では、アイリス20を用いてビーム径調整手段を構成したが、複数枚のレンズからなる可変焦点の光学系を用いてビーム径調整手段を構成することもできる。また、本発明は、第1の光および第2の光を同一光軸上に合成する場合に限らず、互いに平行な光軸上を同一方向に進行するように合成する場合にも有効に適用することができる。

この場合、第1の光および第2の光のビーム径を調整する場合には、それぞれ独立して調整すればよい。

【0069】

また、第1～第3の各偏向手段は、角度調整ミラーに限らず、プリズムや回折格子を用いて構成したり、あるいはそれらを適宜組み合わせて構成したりすることもできる。さらに、第1～第3の各発散角調整手段は、発散角調整レンズに限らず、凹面鏡等の反射鏡や可変焦点の光学系を用いて構成することもできる。

【0070】

また、本発明は、蛍光抑制効果を利用する超解像顕微鏡に限らず、特許文献1に開示されているような二重共鳴吸収過程で誘起される過渡吸収を検出する二波長の光を利用する顕微鏡等、二波長の光を空間的に重ね合わせて使用する走査型光学顕微鏡に広く適用することができる。

特許請求の範囲

1. 少なくとも基底状態を含む3つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第1電子励起状態に励起するための第1の光を発生する第1の光源と、上記分子を上記第1電子励起状態から、よりエネルギー準位の高い第2電子励起状態に励起するための第2の光を発生する第2の光源とを具え、集光光学系により一部重ね合わせて照射して、上記試料からの発光を検出するようにした顕微鏡において、

上記第1の光源からの第1の光を二次元的に偏向する第1の偏向手段と、

上記第2の光源からの第2の光を二次元的に偏向する第2の偏向手段と、

上記第1の偏向手段により偏向された第1の光および上記第2の偏向手段により偏向された第2の光を、同一光軸上または互いに平行な光軸上を同一方向に進行するように合成する合成手段と、

上記合成手段で合成された第1の光および第2の光を同時に偏向する第3の偏向手段とを有することを特徴とする顕微鏡。

2. 上記第1の偏向手段は、互いに独立して偏向角を調整可能な少なくとも二つの角度調整ミラーまたはプリズムを有することを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

3. 上記第2の偏向手段は、互いに独立して偏向角を調整可能な少なくとも二つの角度調整ミラーまたはプリズムを有することを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

4. 上記第3の偏向手段は、互いに独立して偏向角を調整可能な少なくとも二つの角度調整ミラーまたはプリズムを有することを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

5. 上記第1の光源と上記第1の偏向手段との間の光路中および／または上記第2の光源と上記第2の偏向手段との間の光路中に位相変調素子を設けたことを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

6. 上記第1の光源と上記合成手段との間の光路中に、上記第1の光の発散角を調整する第1の発散角調整手段を設けたことを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

7. 上記第2の光源と上記合成手段との間の光路中に、上記第2の光の発散角を調整する第2の発散角調整手段を設けたことを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

8. 上記合成手段で合成された第1の光および第2の光の光路中に、これら

第1の光および第2の光の発散角を同時に調整する第3の発散角調整手段を設けたことを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

9. 上記第1の発散角調整手段が、光学レンズまたは反射鏡からなることを特徴とする請求項6に記載の顕微鏡。

10. 上記第2の発散角調整手段が、光学レンズまたは反射鏡からなることを特徴とする請求項7に記載の顕微鏡。

11. 上記第3の発散角調整手段が、光学レンズまたは反射鏡からなることを特徴とする請求項8に記載の顕微鏡。

12. 上記第1の発散角調整手段および上記第1の偏向手段の光学精度を、上記第1の光の波長に対して $1/10$ 波長以下としたことを特徴とする請求項6に記載の顕微鏡。

13. 上記第2の発散角調整手段および上記第2の偏向手段の光学精度を、上記第2の光の波長に対して $1/10$ 波長以下としたことを特徴とする請求項7に記載の顕微鏡。

14. 上記第1の光および／または上記第2の光のビーム径を調整するビーム径調整手段を設けたことを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

15. 上記集光光学系の焦点面における上記第1の光および上記第2の光の集光状態を観察する観察手段を設けたことを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

16. 少なくとも基底状態を含む3つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第1電子励起状態に励起するための第1の光を発生する第1の光源と、上記分子を上記第1電子励起状態から、よりエネルギー一準位の高い第2電子励起状態に励起するための第2の光を発生する第2の光源とを具え、集光光学系により一部重ね合わせて照射して、上記試料からの発光を検出するようにした顕微鏡であって、

上記第1の光源からの第1の光を二次元的に偏向する第1の偏向手段と、

上記第2の光源からの第2の光を二次元的に偏向する第2の偏向手段と、

上記第1の偏向手段により偏向された第1の光および上記第2の偏向手段により偏向された第2の光を、同一光軸上または互いに平行な光軸上を同一方向に進行するように合成する合成手段と、

上記合成手段で合成された第1の光および第2の光を同時に偏向する第3の偏向手段と、

上記集光光学系の焦点面における上記第1の光および上記第2の光の集光状態を観察する観察手段とを具える顕微鏡の光学調整を行うに当たり、

上記集光光学系の焦点面に反射部材を設置し、上記観察手段により上記焦点面を観察しながら、上記第1の偏向手段および上記第2の偏向手段により上記第1の光の光軸および上記第2の光の光軸を独立して調整すると共に、上記第3の偏向手段により上記第1の光の光軸および上記第2の光の光軸を同時に調整して、上記焦点面における上記第1の光および上記第2の光の位置合わせを行うことを特徴とする顕微鏡の光学調整方法。

17. 上記反射部材としてスライドガラスを用いることを特徴とする請求項16に記載の顕微鏡の光学調整方法。

### 要約書

第1、第2の光の光学的調整を容易かつ高精度にでき、超解像効果や期待する光学性能を確実に発現できる顕微鏡及びその光学調整方法を提供する。試料74に含まれた分子を基底状態から第1電子励起状態に励起する第1の光源11からの第1の光を二次元的に偏向する第1の偏向手段14a, 14bと、上記分子を第1電子励起状態から、よりエネルギー準位の高い第2電子励起状態に励起する第2の光源12からの第2の光を二次元的に偏向する第2の偏向手段17a, 17bと、偏向された第1、第2の光を同一光軸または互いに平行な光軸に合成する合成手段16と、合成された第1、第2の光を同時に偏向する第3の偏向手段19a, 19bとを有し、これら第1～第3の偏向手段により第1、第2の光の光軸を調整して、集光光学系72により一部重ね合わせて試料74に照射することにより、その発光を検出するようとする。

【選択図】

図1